

Syöpään kohdistuvan elimistön immuunipuolustusreaktion merkitys ohutsuolen adenokarsinoomapotilaiden ennusteeseen

Säde Szeto

Lääketieteen kandidaatti

Helsingin Yliopisto

1. painos (2020)

Helsinki 21.11.2020

Tutkielma

sade.szeto@helsinki.fi

Ohjaaja: Toni Seppälä

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Helsingin Yliopisto
Tekijä – Författare – Author Säde Szeto		
Työn nimi – Arbetets titel – Title Syöpään kohdistuvan elimistön immuunipuolustusreaktion merkitys ohutsuolenadenokarsinooma potilaiden ennusteeseen		
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede		
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma	Aika – Datum – Month and year 21.11.2020	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 21+1
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Ohutsuolisyöpä on harvinainen ruoansulatuskanavan syöpä, jonka ennuste on huono, sillä se yleensä havaitaan vasta pitkälle edenneenä lievien ja epäspesifien oireiden vuoksi. Adenokarsinooma on toiseksi yleisin syövän histologinen alatyyppe, joka esiintyy ohutsuolessa.</p> <p>Useissa eri syövässä elimistön immuunipuolustusreaktion voimakkuutta on käytetty syöpien ennustetta arvioidessa. T-lymfosyyttien (CD3+, CD8+) määrästä ja sijainnista muodostettava Immune Cell Score (ICS)-pisteytysjärjestelmää voidaan käyttää syövässä, kuten paksusuolisyövässä, perinteisen TNM-luokituksen ohella, ennusteellisenä työkaluna. Sen sijaan immuunivastetta hiljentävästä PD-1/PD-L1-reitin aktivaatiosta syövän ennusteellisenä tekijänä on ristiriitaista näyttöä.</p> <p>Ohutsuolen adenokarsinoomassa immunologisten parametrien ennusteellista arvoa ei ole juuri aiemmin arvioitu. Tavoitteenamme oli arvioida syövän ympäristössä esiintyvien tulehdussolujen piirteiden korrelaatiota taudin ennusteeseen.</p> <p>Analysoimme syöpäkasvaimien sytotoksisten T-lymfosyyttien (CD3+, CD8+) tiheydet syöpäsolukossa sekä terveen kudoksen ja syöpäkudoksen rajalla. Näiden perusteella luokittelimme syöpäkasvaimet Immune Cell Score-luokkiin Vertasimme Immune Cell Scoren vaikutusta taudin ennusteeseen. Lisäksi analysoimme PD-1 ja PD-L1 ilmentymistä syöpään tunkeutuvien tulehdussolujen ja syöpäsolujen pinnalla. PD-1/PD-L1 ilmentymisen vaikutusta vertasimme taudin tautispesifiin- ja kokonaiselossaoloon. Muodostimme edelleen näistä kolmesta immunologisesta parametrasta (ICS, PD-1 ja PD-L1) syöväälle Immunoprofiilin ja arvioimme Immunoprofiili-luokan vaikutusta taudin ennusteeseen.</p> <p>Yksittäisinä muuttujina PD-1:n voimakas ilmentyminen, PD-L1:n runsas ilmentyminen syövän sisään tunkeutuvissa tulehdussoluissa ja korkea Immune Cell Score vaikuttivat myönteisesti tautikohtaiseen- ja kokonaisennusteeseen. Pelkästään voimakas PD-L1:n ilmentyminen syöpäsolukoon tunkeutuvien tulehdussolujen pinnalla osoitti itsenäistä ennusteellista arvoa monimuuttuja-analyysissä. Lisäksi korkea Immunoprofiili-luokka antoi merkityksellistä informaatiota taudin ennusteesta.</p> <p>(206 sanaa)</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords small bowel; adenocarcinoma; tumor infiltrating lymphocytes; PD-1; PD-L1		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Terkko ja Helda		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	2
3	Tutkimusaineisto ja menetelmät	4
3.1	Potilaat	4
3.2	Immunohistokemialliset värjäykset	4
3.3	Syöpien aiheuttaman immuunivasteen pisteytys	5
3.4	Tilastolliset analyysit	7
4	Tulokset	7
4.1	Syöpäsolukon läheisyydessä esiintyvien tulehdussolujen kliinis-patologisten piirteiden korrelaatio	7
4.2	Yksittäisten muuttujien ennusteellinen arvo	10
4.3	Monimuuttuja-analyysit	11
5	Pohdinta	14
6	Yhteenveto	17
7	Oma työpanos vertaisarvioidussa artikkelissa	18
	Lähdeluettelo	19

1 Johdanto

Harvinaisuutensa vuoksi ohutsuolen adenokarsinooma (small bowel adenocarcinoma, SBA) on huonosti tunnettu tauti. SBA diagnosoidaan usein jo pitkälle edenneenä, jolloin parantavat hoitomahdollisuudet ovat vähissä.

Useimmissa syövässä elimistön immuunipuolustusreaktion voimakkuuden on havaittu vaikuttavan taudin ennusteeseen. Erityisesti tutkimuksen alla on ollut syövän ympäristössä esiintyvien tulehdussolujen tyypin, tiheyden ja sijainnin vaikutus taudin ennusteeseen. Tutkimusten mukaan syövän ennuste on parempi, jos elimistön immuunivaste on aktiivinen. Tällöin myös taudin ennustetta parantavat immunologiset hoidot voivat toimia paremmin. Sen sijaan immuunijärjestelmän säätelyyn vaikuttavan PD-1/PD-L1 (programmed cell death ligand-1 / programmed cell death ligand -1) signalointireitin aktivoitumisen vaikutuksista taudin ennusteeseen on ristiriitaista näyttöä eri syöpätyypeissä.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää SBA:n aiheuttamaa immuunivastetta, sekä syövän läheisyydessä esiintyvien puolustussolujen T-lymfosyyttien piirteitä. Kuvaamme SBA:n aiheuttamaa immuunipuolustusreaktiota arvioimalla syöpään tunkeutuvien T-solujen määrää, sekä niiden pinnalla esiintyvän PD-1:n että PD-L1:n ilmentymisen avulla. Syöpäsolukoon tunkeutuvien tulehdussolujen määrää arvioidaan Immune Cell Score-pisteytyksellä, joka muodostuu CD3 ja CD8 positiivisten solujen määrästä syöpäsolukossa ja syöpäsolukon ja terveen kudoksen rajalla. Vertaamme Immune Cell Score-luokkaa sekä PD-1:n, että PD-L1:n ilmentymistä tulehdussolujen pinnalla taudin ennusteen kanssa.

Syventävä tutkielmani perustuu artikkeliimme ”Prognostic Value Of Immune Environment Analysis in Small Bowel adenocarcinomas in Verified Mutational Landscape and Predisposing Conditions” (Cancers 7/2020), jossa tutkimusaineisto, sekä tutkimusmenetelmät ja tulokset on esitetty tarkemmin (1).

2 Kirjallisuuskatsaus

Ohutsuolen syöpä on harvinainen ruoansulatuskanavassa esiintyvä pahanlaatuinen kasvain, sillä vain 3% ruoansulatuskanavan syöivistä sijaitsee ohutsuolessa (2). Ohutsuolisyyöpiä on neljää eri histologista tyyppiä, joista adenokarsinooma on toiseksi yleisin, kattaen noin 40 % ohutsuolen alueen syöivistä. 50–55 % ohutsuolen adenokarsinoomista sijaitsee pohjukaissuolessa (duodenum), 16–30 % tyhjäsuolella (jejunum), sekä 13–20 % sykkyräsuolella (ileum) (3, 4). Suurin osa ohutsuolen adenokarsinoomista on sporadisia, mutta usein taudin kehittymiseen liittyy altistava tekijä. Esimerkiksi geneettiset taudit, kuten familiaalinen adenomatoottinen polypoosi (FAP), Lynchin oireyhtymä (Lynch syndrome, LS), Peutz-Jeghersin syndrooma sekä juveniili polypoosi altistavat SBA:n kehittymiselle. Tulehdukselliset suolistosairaudet, kuten keliakia ja Chronin tauti altistavat SBA:lle kroonisen limakalvon tulehduksen vuoksi. (5) Sairauksien ohella myös tupakointi, runsas alkoholin, punaisen ja käristetyn lihan, sekä sokerin kulutus lisäävät riskiä (6, 7). Kuten paksusuolen yleisimmän pahanlaatuisen kasvaimen, kolorektaalikarsinooman (*colorectal carcinoma*, CRC), myös SBA:n uskotaan kehittyvän hyvänlaatuisen rauhaskasvaimen, adenooman kautta. Tästä syystä on hyvin todennäköistä, että näiden kahden geneettisessä synnyssä on samoja piirteitä. (8)

Suurin osa ohutsuolen adenokarsinoomista diagnosoidaan jo pitkälle edenneenä, sillä tauti aiheuttaa varhaisessa vaiheessa vain lieviä ja epäspesifejä oireita, kuten vatsakipua, maha-suolikanavan verenvuotoa, anemiaa ja pahoinvointia. Oireiden alusta diagnoosiin pääsemiseen kuluu keskimäärin 2–8 kuukautta. Koska tauti diagnosoidaan usein jo pitkälle kehittyneenä, sen ennuste on usein varsin huono. Paikallisessa taudissa 5-vuotisennuste vaihtelee lähteestä riippuen 35–80 %. Paikallisiin imusolmukkeisiin levinneessä taudissa 5-vuotisennuste vaihtelee 8–47 %:n välillä, metastaatit taudin vastaava ennuste on 5 %. (8) Crohnin tautiin assosioituvalla SBA:lla on huonompi ennuste sporadiseen tautiin verrattuna. Syitä huonommalle ennustelle ovat myöhäisempi diagnostiikka oireiden sekoittuessa Crohnin taudin oireisiin, sekä syövän leviäminen jejunumiin ja ileumiin. (9)

Yksi merkittävimmistä ennustetekijöistä pahanlaatuisen kasvaimen käyttäytymiselle, on elimistön puolustusreaktion eli immuunivasteen voimakkuus syöpäkasvainta kohtaan. Immuunivastetta kuvaa syövän läheisyydessä esiintyvien tulehdussolujen määrä, tyyppi ja sijainti. Syövän sisään tunkeutuvien CD3+ T-lymfosyyttien ja niiden alatyypin, CD8+ sytotoksisten T-lymfosyyttien runsas määrä assosioituu parempaan ennusteeseen useissa syövässä, kuten kolorektaalikarsinoomassa, haima-, rinta ja mahasyövässä, melanoomassa, sekä suurisoluisessa keuhkasyövässä (10, 11). Syöpäsolukon läheisyydessä esiintyvien tulehdussolujen tyyppin, tiheyden ja sijainnin perusteella on kehitetty pisteytysjärjestelmä Immune Cell Score (ICS), joka on osoittautunut tehokkaaksi työkaluksi erilaisten syöpien, kuten kolorektaalikarsinooman, ennusteen arviointiin. ICS muodostuu CD3+ ja CD8+ lymfosyyttien tiheydestä syöpäsolukon ja terveen kudoksen rajalla, sekä syöpäsolukon ytimessä. (12)

Kopiovirheenkorjaus (mismatch-repair, MMR) -entsyymien geenin mutaatio aiheuttaa syöpäsoluissa normaalia enemmän mutaatioita, koska epänormaali MMR-entsyymi ei kykene korjaamaan DNA:n kahdentumisessa tapahtuvia virheitä normaalisti, mikä puolestaan johtaa hypermutatoitumiseen ympäri kasvaingenomia. Syöpiä, joissa MMR-entsyymiä koodittava geeni on mutatoitunut, kutsutaan mikrosatelliitti-instabiileiksi (MSI). Mikrosatelliittistabiileita (MSS) ovat puolestaan syövät, joissa MMR-entsyymi toimii normaalisti. SBA:ssa MSI-syöpien osuus on 5–35 % (7).

MSI:n ennusteellinen merkitys suoliston syövässä on tunnettu (13). MSI-syöpien suurempi mutaatiotaakka (tumor mutation burden, TMB), aiheuttaa voimakkaamman puolustusreaktion kasvainta kohtaan, mikä parantaa syövän ennustetta (14). SBA:ssa mutaatiotaakan on todettu olevan mahasyöpää ja kolorektaalikarsinoomaa suurempi (15). ICS on osoittanut, että immuunivasteella on kolorektaalikarsinoomassa merkittävä vaikutus ennusteeseen MMR-entsyymien toiminnasta huolimatta, vaikka MSI-syövässä immuunivaste on hyvin voimakas jo ennestään (16, 17).

Yksi syövän tunnuspiirteistä on sen pyrkimys piiloutua elimistön puolustusjärjestelmältä (18). Normaalisti PD-1 on aktivoidun T-solun pinnalla oleva reseptori, joka vaimentaa

immuunivastetta (19). Eräs syövän mekanismi välttää immuunipuolustusreaktiota on aktivoida PD-1/PD-L1-signaalointireitti, jolloin elimistön oma puolustusreaktio vaimenee (18, 20). Kuitenkaan tarkkaa PD-1/PD-L1:n aktivoitumisen roolia kaikissa syövissä ei vielä täysin tunneta. Kolorektaalikarsinoomassa MSI-syöpien PD-1 ja PD-L1 ilmeneminen tulehdussoluissa oli voimakkaampaa kuin MSS-syövissä. Lisäksi kolorektaalikarsinoomassa voimakas immuunireaktio korreloi paremman ennusteen kanssa. (21)

3 Tutkimusaineisto ja menetelmät

3.1 Potilaat

Tutkimuksessa käytettiin 106 SBA-potilaan kasvainnäytteitä, joista 94 soveltui immunohistokemialliseen analyysiin. Näytteet on kerätty vuosina 2003–2011 Suomessa hoidossa olleilta potilailta. Syöivistä 18 % sijaitsi duodenumissa, 53 % jejunumissa ja 19 % ileumissa. 10 %:ssa tapauksista syövän tarkka sijainti ei ollut tiedossa. Naisia oli 53 % potilaista, ja leikkauksen aikainen mediaani-ikä oli 62. Mediaani seuranta-aika diagnoosin jälkeen oli 44 kuukautta. Yhdeksällä potilaalla oli keliakia (10 %), neljällä Crohnin tauti (4 %), neljällä LS (4 %) ja kahdella FAP (2 %). 14 syöpää (15 %) oli MSI-syöpiä. Mutaatiotaakka määriteltiin suureksi, mikäli mutaatioita oli 10 miljoonaa emäsparia kohden (10/Mb, megabase). Syöpien TNM-luokka painottui vaikeampaan tautiin: 37 % oli IV-luokkaa, 26 % III-luokkaa ja 21 % II-luokkaa, kun taas vain 4 % oli I-luokkaa. TNM-luokkaa ei ollut määritetty 12 %:ssa syöivistä. (1)

3.2 Immunohistokemialliset värjäykset

Syöpänäytteet käsiteltiin kunkin paikallisen sairaanhoitopiirin patologian laboratorion protokollan mukaisesti ja näytteistä valmistettiin formaliinifiksoidut parafiiniblokki (formalin fixed paraffin embedded, FFPE), joista myöhemmin leikattiin 3µm paksuiset kudosleikkeet immunohistokemiallisiin värjäyksiin. Peräkkäisille leikkeille tehtiin CD3 ja CD8 (anti-CD3 LN 10, 1:200, Novocastra; anti-CD8 SP16, 1:400, Thermo Scientific) vasta-ainevärjäykset, sekä PD-1 ja PD-L1 (anti-PD-1 SP269, 1:50, Spring Bioscience;

anti-PD-L1 E1L3N, 1:100, Cell Signaling Technology) vasta-ainevärjäykset. Värjäykset tehtiin automatisoidusti BOND-III-värjäyslaitteella (Leica Biosystems). Signaalin visualisointi tehtiin diaminobentsiinillä, sekä osat vastavärjättiin hematoksyliinillä. Leikkeet skannattiin NanoZoomer-XR:lla (Hamamatsu Photonics) 20-kertaisella suurennoksella. (1)

3.3 Syöpien aiheuttaman immuunivasteen pisteytys

Analysoimme edellä skannatut näytteet avoimen lähdekoodin digitaalisen patologian sovelluksella, QuPath:lla (22). Analysoitavia alueita olivat syöpäsolukon ydin sekä invasiivinen vyöhyke, eli syövän ja terveen kudoksen raja. CD3, CD8, sekä PD-1 väreillä positiivisesti värjäytyneiden lymfosyyttien tiheydet laskettiin QuPath:lla. Invasiivinen vyöhyke valittiin silmämääräisesti merkintätyökalulla (annotation brush), jonka halkaisija oli 730um. Analysoitujen alueiden keskimääräiset pinta-alat värjäysalueittain löytyvät taulukosta 1. Koska immunohistokemiallisten näytteiden analysoiminen perustuu subjektiivisiin arvioihin, on toistettavuus usein vaihtelevaa. Tästä syystä tutkimuksessamme kaksi tutkijaa analysoi näytteiden värjäykset. Näiden pohjalta laskimme uudelleenkäytettävyyttä kuvaavat arvot (interrater reability, IRR) – tulokset ovat sitä toistettavampia mitä lähempänä IRR on lukua 1. Tuloksemme olivat varsin samankaltaisia, eli tässä tilanteessa toistettavia (taulukko 1). (1)

Raja-arvot olivat samat 5:n ja 10 vuoden tautispesifille selviytymiselle ROC-käyrillä. Potilaat jaettiin matalan ICS:n (pisteytysluokat 0–2) ja korkean ICS:n (pisteytysluokat 3–4) ryhmiin jatkoanalyysihin. PD-1 määritettiin positiiviseksi, mikäli PD-1-positiivisten solujen määrä ylitti raja-arvon (syöpäsolukon ytimessä CD3+: 715, CD8+: 255, PD-1+: 48 ja invasiivisella vyöhykkeellä CD3+: 1327, CD8+: 598, PD-1+: 27) sekä invasiivisella vyöhykkeellä, että syövän ytimessä. (1)

Taulukko 1. Taulukossa on esitetty IRR-arvot, analysoitavien alueiden pinta-alat, sekä ICS:n raja-arvot sekä syöpäsolukon ytimessä, että invasiivisella rajalla.

		IRR-arvot (luottamusväli)		
		CD3	CD8	PD-1
Syöpäsolukon ydin		0.96 (CI95% 0.93–0.97)	0.98 (CI95% 0.96–0.99)	0.73 (CI95% 0.57–0.83)
Invasiivinen vyöhyke		0.89 (CI95% 0.83–0.92)	0.90 (CI95% 0.84–0.94)	0.75 (CI95% 0.58–0.84)

		Analysoitavat alueet		
		CD3	CD8	PD-1
Syöpäsolukon ydin		24.9 mm ²	22.3 mm ²	18.5 mm ²
Invasiivinen vyöhyke		12.2 mm ²	11.8 mm ²	10.5 mm ²

		Raja-arvot ICS:lle		
		CD3	CD8	PD-1
Syöpäsolukon ydin		715	255	48
Invasiivinen vyöhyke		1327	598	27

PD1-positiivisten solujen värjäyksen intensiteetti arvioitiin visuaalisesti, sekä määrä laskettiin Qupath:lla. Sekä syöpäsolujen (tumor cells, TC), että syöpään tunkeutuvien tulehdussolujen (immune cells, IC) PD-L1 ilmentyminen analysoitiin. Syövä arvioitiin PD-L1-positiiviseksi, mikäli >5 % syöpäsoluista (PD-L1^{TC}) ja/tai siihen tukeutuvista tulehdussoluista (PD-L1^{IC}) oli positiivisia keskivertaisella tai vahvalla intensiteetillä (21).

Laskimme syöville yhdistelmäarvon, aiemmin paksusuolisyövässä validoidun Immuuniprofiilin (Immunoprofile, IP), joka koostuu ICS:sta ja PD-1:stä sekä PD-L1-positiivisuudesta (21). Korkea ICS, suuri PD-1+ solujen määrä ja PD-L1^{IC}-positiivisuus antoivat yhden pisteen kukin, jolloin Immuuniprofiili oli korkein mahdollinen, eli 3. Mikäli ICS ja PD-1 olivat matalat ja PD-L1^{IC}-negatiivinen, Immuuniprofiili oli matalin, eli 0. (21) Pienen otoksen vuoksi, Immuuniprofiileista muodostettiin edelleen kaksi

luokkaa, matala (IP 0–1) ja korkea (IP 2–3). Immunoprofiilin määrittäminen jäi kahdesta näytteestä tekemättä, koska näytteiden ICS, PD-1 tai PD-L1 arvot puuttuivat. (1)

3.4 Tilastolliset analyysit

Syöpien kliinis-patologisia muuttujia vertailtiin Pearsonin korrelaatiokerrointa ja Mantelin-Haenszelin testiä käyttämällä. Fisherin tarkkaa testiä käytettiin puolestaan arvioimaan muuttujia, joiden havaintoaste oli niukka. Kaplan-Meier-kuvaajalla arvioitiin tautispesifiä (disease-specific survival, DSS) ja kokonaiselossaoloa (overall survival, OS). Log rank-testiä käytettiin DSS:n ja OS:n erojen vertailuun. Edellä mainittujen pituudet laskettiin taudin diagnosoinnista seurannan loppuun tai leikkauspäivästä kuolemaan. Mikäli leikkauspäivän ja kuoleman välillä oli alle 30 vuorokautta, kuolema laskettiin postoperatiiviseksi. Tilastollisesti merkittäväksi p-arvoksi asetimme kynnsarvoksi < 0.05 . Yhden muuttujan analyysissä olleiden muuttujien, joiden p-arvo < 0.20 analysoitiin monimuuttuja-analyysissä iän ja sukupuolen kanssa. Tilastolliset analyysit suoritettiin käyttämällä IBM SPSS Statistics:iä (versio 25.0; SPSS Inc. Chicago, IL, USA). (1)

4 Tulokset

4.1 Syöpäsolukon läheisyydessä esiintyvien tulehdussolujen ja kliinis-patologisten piirteiden korrelaatio

PD-1-positiivisia lymfosyyttejä oli merkittävässä määrin 27:ssä (29 %) syöpänäytteessä. PD-L1^{IC} oli positiivinen (>5 % syöpäsolukoon tunkeutuvista tulehdussoluista soluista ilmentyy PD-L1) 24:ssä (26 %) näytteessä. PD-L1^{TC} puolestaan (>5 % syöpäsoluista ilmentyy PD-L1) oli positiivinen seitsemässä (7 %) näytteessä. Syöpänäytteistä 27:ssä (29 %) ICS oli 0, 14:sta (15 %) 1, 17:sta (18 %) 2, 11:sta (12 %) 3 ja 24:llä (26 %) 4. Immunoprofiili-luokka syöpänäytteissä puolestaan oli 41:ssä (44 %) 0, 21:ssä (22 %) 1, 11:sta (12 %) 2 ja 19:sta (20 %) 3. (1)

ICS:n assosiaatio kliinis-patologisiin muuttujiin on esitetty taulukossa 2. Matala ICS (0-2) tai korkea ICS (3-4) ei korreloitunut tilastollisesti merkittävästi iän, sukupuolen, syövän sijainnin tai keliakian kanssa. Kuitenkin korkea ICS korreloi MSI-syöpien ($p=0.005$), sekä matalan TNM-luokan ($p=0.022$) ilmentymisen kanssa. Crohnin tautiin liittyvistä SBA:sta 75 % ICS oli 0, kun taas 75 % Lynchin syndroomaan liittyvistä SBA:sta ICS oli 4. (1)

Matalan TNM-luokan syövässä oli tiheämmin PD-1-positiivisia soluja, kuin korkean TNM-luokan. 42 % I- ja II-luokan syövästä oli vahvasti PD-1-positiivisia ($p=0.005$), kun taas IV-luokan syövästä vain 9 % olivat vahvasti PD-1-positiivisia. 86 %:lla MSI-syövästä oli runsaasti PD-1-positiivisia soluja ($p<0.001$). MSI-syövät assosioituivat PD-L1^{IC}-positiivisuuteen, sillä 64 % niistä oli PD-L1^{IC}-positiivisia ($p<0.001$). PD-L1^{TC}:lla oli korkeintaan keskinkertainen korrelaatio syövän erilaistumisasteen (gradus) kanssa, sillä vain 67 % syövästä oli gradus 3 ($p=0.034$). Myös ICS:lla, PD-1:n ilmentymisellä ja PD-L1^{IC}:n positiivisuudella oli vahva korrelaatio toistensa kanssa ($p<0.001$). (1)

Korkea Immunoprofiili assosioitui matalaan TNM-luokkaan, sillä IV-luokan SBA:sta 88 % kuuluivat matalan Immunoprofiilin luokkaan 0 tai 1 ($p=0.003$). Lisäksi Immunoprofiili assosioitui MSI-syöpiin, koska 86 % niistä kuului korkeaan IP-luokkaan (IP 2 tai 3 $p<0.001$). Lisäksi kaikilla LS assosioituvilla SBA:lla oli korkea IP-luokka ($p=0.018$, Taulukko 3). Suuri mutaatiotaakka assosioitui MSI-syöpiin, keliakiaan (56 %:lla keliakiaan liittyvistä SBA:sta, $p=0.012$) korkeaan ICS:een, voimakkaaseen PD-L1 ja PD-1 ilmentymiseen sekä korkeaan IP-luokkaan. Vain neljällä (5 %) MSS-syöväällä oli suuri mutaatiotaakka. (1)

Taulukko 2. Kliinis-patologiset muuttujat ICS:n suhteen (1).

	Matala ICS N = 58 (% of rivistä)	Korkea ICS N = 35 (% rivistä)	Yhteensä N = 93 (% sarakkeesta)	p-arvo
Ikä				
< 60 vuotta	23 (61)	15 (40)	38 (41)	0.761
≥ 60 vuotta	35 (64)	20 (36)	55 (59)	
Sukupuoli				
Nainen	29 (66)	15 (34)	44 (47)	0.504
Mies	29 (59)	20 (41)	49 (53)	
TNM-luokka				
I	1 (25)	3 (75)	4 (4)	0.022*
II	11 (55)	9 (45)	20 (22)	
III	12 (50)	12 (50)	24 (26)	
IV	26 (76)	8 (24)	34 (37)	
Erilaistumisaste				
1	10 (59)	7 (41)	17 (19)	0.889*
2	35 (63)	21 (38)	56 (63)	
3	9 (56)	7 (44)	16 (18)	
MMR-status				
MSI	4 (29)	10 (71)	14 (15)	0.005
MSS	54 (68)	25 (32)	79 (85)	
Syövän sijainti				
Duodenum	9 (53)	8 (47)	17 (18)	0.292
Jejunum	33 (66)	17 (34)	50 (54)	
Ileum	9 (53)	8 (47)	17 (18)	
Perinnölliset syöpäsairaudet				
Lynchin syndrooma	1 (25)	3 (75)	4 (4)	0.265
FAP	1 (50)	1 (50)	2 (2)	
Ei	56 (64)	31 (36)	87 (94)	
Crohnin tauti				
Kyllä	3 (75)	1 (25)	4 (4)	1.000**
Ei	55 (62)	34 (38)	89 (95)	
Keliakia				
Kyllä	4 (44)	5 (56)	9 (10)	0.289**
Ei	54 (64)	30 (36)	84 (90)	

Taulukko 3. Kliinispatologiset muuttujat Immunoprofiilin suhteen (1).

	Immunoprofiili 0 n = 47 (% rivistä)	Immunoprofiili 1 n = 18 (% rivistä)	Immunoprofiili 2 n = 13 (% rivistä)	Immunoprofiili 3 n = 14 (% rivistä)	Yhteensä n = 92 (% sarakkeesta)	p-arvo
Ikä						
< 60 vuotta	18 (49)	8 (22)	5 (14)	6 (16)	37 (40)	0.967
≥ 60 vuotta	29 (53)	10 (18)	8 (15)	8 (15)	55 (60)	
Sukupuoli						
Nainen	23 (54)	9 (21)	5 (12)	6 (14)	43 (47)	0.894
Mies	24 (49)	9 (18)	8 (16)	8 (16)	49 (53)	
TNM-luokka						
I	1 (25)	1 (25)	0 (0)	2 (50)	4 (5)	0.003*
II	8 (40)	3 (15)	4 (20)	5 (25)	20 (25)	
III	8 (35)	5 (22)	6 (26)	4 (17)	23 (28)	
IV	22 (65)	8 (24)	2 (6)	2 (6)	34 (42)	
Erilaistumisas						
te	8 (47)	4 (24)	4 (24)	1 (6)	17 (19)	0.544*
1	29 (53)	9 (16)	8 (15)	9 (16)	55 (63)	
2	7 (44)	4 (25)	1 (6)	4 (25)	16 (18)	

MMR-status						
MSS	45 (58)	18 (23)	8 (10)	7 (9)	78 (85)	<0.00
MSI	2 (14)	0 (0)	5 (36)	7 (50)	14 (15)	1
Syövän sijainti						
Duodenum	7 (41)	3 (18)	4 (24)	3 (18)	17 (21)	0.563
Jejunum	27 (55)	9 (18)	6 (12)	7 (14)	49 (59)	
Ileum	7 (41)	5 (35)	1 (6)	3 (18)	17 (21)	
Lynchin syndrooma						
Ei	47 (53)	18 (21)	11 (13)	12 (14)	88 (96)	0.018
Kyllä	0 (0)	0 (0)	2 (50)	2 (50)	4 (4)	
Crohnin tauti						
Ei	45 (51)	17 (19)	13 (15)	13 (15)	88 (96)	0.821
Kyllä	2 (50)	1 (25)	0 (0)	1 (25)	4 (4)	
Keliakia						
Ei	43 (52)	17 (21)	11 (13)	12 (15)	83 (90)	0.745
Kyllä	4 (44)	1 (11)	2 (22)	2 (22)	9 (10)	

4.2 Yksittäisten muuttujien ennusteellinen arvo

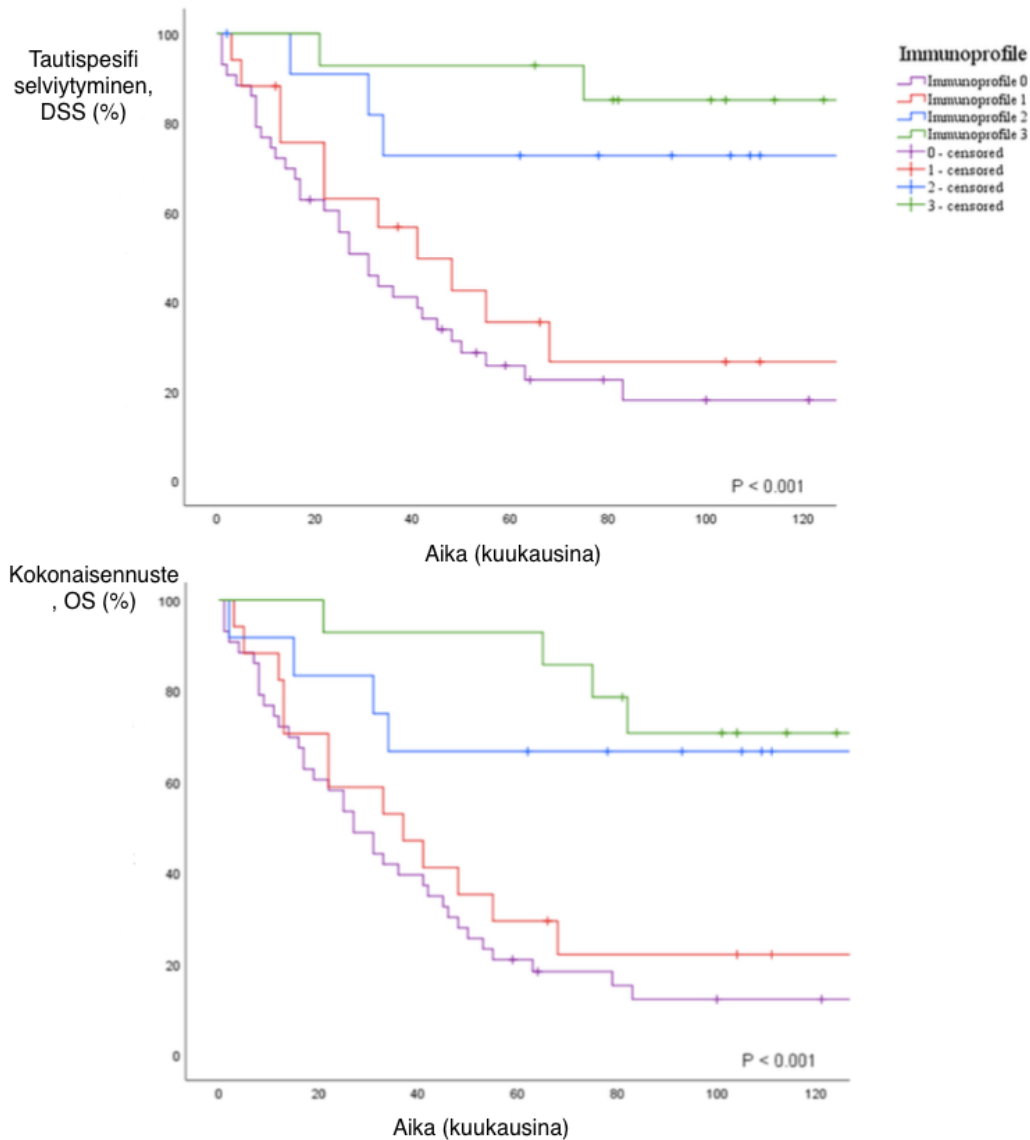
Korkea ICS, voimakas PD-1:n ilmentyminen ja PD-L1^{IC}-positiivisuus, eli korkea Immunoprofiili vaikutti myönteisesti SBA:n ennusteeseen ($p < 0.001$ kullekin). Korkean IP-luokan tautikohtainen 5-vuotisennuste oli 93 %, kun taas matalan IP-luokan syövällä vastaava ennuste oli 26 %, sekä vastaavat kokonaisennusteet matalalle Immunoprofiilille olivat 93 % ja korkealle 21 % ($p < 0.01$). Korkean IP-luokan ennustetta suosiva vaikutus on esitetty tarkemmin Kaplan Meier-kuvaajassa (kuva 1).

Keskimäärin 5-vuotiskokonaisennuste matalalle ICS:lle, PD-L1^{IC}-negatiiviselle, PD-1:stä lievästi ilmentyville ja matalalle Immunoprofiilille olivat 27, 31, 31 ja vastaavasti 27 kuukautta. Puolestaan tautikohtainen 5-vuotisennuste oli 31 kuukautta kaikille. (1)

Suuren mutaatiotaakan syövissä 5-vuotistautikohtainen ennuste oli 85 %, kun taas matalan mutaatiotaakan syövissä vastaava ennuste oli 39 % ($p = 0.003$). Myös kokonaisennuste oli parempi suuren mutaatiotaakan syövissä (79 %) kuin matalan (34 %), $p = 0.001$. Myös MSI-syövillä (85 %) oli parempi tautiskohtainen 5-vuotisennuste kuin MSS-syövillä (39 %), $p = 0.003$. Lisäksi MSI-syöpien kokonaisennuste oli merkittävästi parempi (34 % vs 79 %, $p = 0.001$). Duodenumissa (50 %) tai jejunumissa (52 %) sijaitsevien syöpien tautikohtainen 5 vuoden ennuste oli merkittävästi parempi, kuin ileumissa (34 %) sijainneiden ($p = 0.045$). 5 vuoden kokonaisennusteet olivat vastaavasti 47 % ja 51 % sekä ileumissa 21 % ($p = 0.014$). Keliakian samanaikainen ilmentyminen vaikutti myönteisesti sekä tautikohtaiseen 5 vuoden ennusteeseen (78 % vs 42 %, $p = 0.045$), että 5 vuoden kokonaisennusteeseen (78 % vs 37 %, $p = 0.014$). Korkea

TNM-luokka puolestaan assosioitui huonompaan ennusteeseen, IV-luokan syöpien 5 vuoden kokonais- ja tautikohtainen ennuste oli vain 7 % ($p < 0.001$). (1)

Kuva 1. 5 vuoden tautispesifi- ja kokonaiselossaolo Immunoprofiilin suhteen (1).



4.3 Monimuuttuja-analyysi

Yksittäisten muuttujien analyysin perusteella monimuuttuja-analyysiin valikoituivat MMR-status, TNM-luokka, ICS, PD-1, PD-L1^{IC}-positiivisuus, sekä syövän sijainti sukupuolen ja iän lisäksi. Näistä vain PD-L1^{IC} oli itsenäinen ennusteellinen tekijä monimuuttuja-analyysissä (DSS:n riskisuhde (hazard ratio, HR) oli 4.73, $p = 0.020$, [95 % luottamusväli 1.27–17.57] ja OS:lle HR=3.88, $p = 0.018$, [95 % luottamusväli 1.26–11.93]). (1)

Immunologiset parametrit ICS, PD-1 ja PD-L1^{IC} on esitetty monimuuttuja-analyysissä taulukossa 4. MSS-syöpien riski päätetapahtumalle verrattuna MSI-syöpiin seurannan aikana oli 12-kertainen (HR 12.18, [95 % luottamusväli 1.37–108.21], $p=0.025$). TNM-luokituksen mukaan luokan-IV syövillä on huonompi ennuste kuin I-luokan syövillä (HR 17.16, [95 % luottamusväli 1.44–204.47], $p=0.001$ ja HR 6.64, [95 % luottamusväli 1.08–41.07], $p<0.001$). Ileumissa sijainneiden syöpien ennuste oli huonoin muihin sijainteihin nähden (HR 7.83, DSS:lle, [95 % luottamusväli 1.55–39.62], $p<0.001$ ja OS:lle HR 7.26 [95 % luottamusväli 1.57–33.54]), $p=0.001$). (1)

Immunoprofiili suhteutettiin sukupuoleen, ikään, MMR-statukseen, TNM-luokkaan ja syövän sijaintiin monimuuttuja-analyysissä (taulukko 5). Kaplan-Meierin estimaatin mukaan tautikohtainen- ja kokonaisennuste olivat yhdenvertaiset molemmissa Immunoprofiili-luokissa. Kaplan-Meier-analyysin mukana matalan ja korkean Immunoprofiilin vaikutus kokonaiselossaoloon (HR 3.57, [95 % luottamusväli 1.20–10.62], $p=0.022$) ja tautispesifiin elossaoloon (HR 6.34, [95 % luottamusväli 1.61–24.97], $p=0.008$) olivat samaa tasoa. Yli 60-vuoden ikä toimi ennustetta heikentävänä tekijänä, sekä tautispesifiin elossaoloon (HR 2.44, [95 % luottamusväli 1.05–5.67], $p=0.038$) että kokonaiselossaoloon (HR 2.61, [95 % luottamusväli 1.18–5.79], $p=0.018$). TNM-luokka säilyi riippumattomana ennusteellisena tekijänä (IV-luokka HR 32.91 DSS:llr ja 13.24 [95 % luottamusvälit 2.88–375.66 ja 2.23–78.55] OS:lle ($p<0.001$ kummallekin)). Myös syövän sijainti ileumissa säilyi itsenäisenä ennusteellisena tekijänä (HR 3.37 DSS:lle, $p=0.001$ ja HR 2.83 OS:lle, $p=0.002$, [95 % luottamusvälit 0.79–14.32 ja 0.70–11.41]). (1)

Vain PD-L1^{IC} ilman MMR-statusta säilyi itsenäisenä ennusteellisena tekijänä monimuuttuja-analyysissä (HR 5.87 DSS:lle, $p=0.009$ ja 4.94 OS:lle, $p=0.007$, [95 % luottamusvälit 1.55–22.28 ja 1.55–15.69]). Matalan Immunoprofiilin HR oli 11.96 DSS:lle ja OS:lle 7.54 ($p<0.001$ molemmille, [95 % luottamusvälit 3.39–42.15 ja 2.75–20.67]), MMR-status ei ollut ennusteellinen tekijä Immunoprofiilin kanssa, sekä kaikki paitsi yksi MSI syöivistä kuuluivat korkeaan Immunoprofiili-luokkaan. MMR-status ei

ollut ennusteellinen tekijä Immunoprofiili-mallissa. Neljästätoista MSI-syövästä 29 % jäi tutkimuksesta pois puutteellisten tietojen vuoksi. (1)

Taulukko 4. Monimuuttuja-analyysi ICS, PD-1 ja PD-L1^{IC}. (1)

	Yksittäismuuttuja-analyysi	Tautispesifi elossaolo (n = 68)		Kokonaiselossaolo (n = 68)	
	p-arvo	HR (95 % CI)	p-arvo	HR (95 % CI)	p-arvo
Ikä					
< 60 vuotta	DSS: 0.614	1	0.146	1	0.052
≥ 60 vuotta	OS: 0.640	1.89 (0.80–4.47)		2.22 (0.99–4.96)	
Sukupuoli					
Nainen	DSS: 0.829	1	0.251	1	0.446
Mies	OS: 0.536	0.65 (0.31–1.35)		0.76 (0.38–1.54)	
TNM-luokka					
I		1	0.001	1	<0.001
II	DSS: <0.001	2.03 (0.18–22.44)		0.62 (0.11–3.42)	
III		3.15 (0.30–32.67)		0.85 (0.16–4.52)	
IV	OS: <0.001	17.16 (1.44–204.47)		6.64 (1.08–41.07)	
MMR-status					
MSS	DSS: 0.010	5.83 (0.66–51.41)	0.112	12.18 (1.37–108.21)	0.025
MSI	OS: 0.004	1		1	
Immune cell score					
Matala	DSS: 0.001	1.96 (0.79–4.85)	0.145	2.33 (0.98–5.57)	0.056
Korkea	OS: <0.001	1		1	
PD-1					
Matala	DSS: <0.001	1.13 (0.27–4.78)	0.868	0.51 (0.14–1.84)	0.307
Korkea	OS: <0.001	1		1	
PD-L1^{IC}					
Matala	DSS: <0.001	4.73 (1.27–17.57)	0.020	3.88 (1.26–11.93)	0.018
Korkea	OS: <0.001	1		1	
Syövän sijainti					
Duodenum	DSS: 0.043	1	<0.001	1	<0.001
Jejunum	OS: 0.015	0.88 (0.25–3.08)		1.00 (0.31–3.21)	
Ileum		7.83 (1.55–39.62)		7.26 (1.57–33.54)	

(HR= hazard ratio, riskisuhde, CI= confidence interval, luottamusväli, DSS= disease-specific survival, tautispesifi elossaolo, OS= overall survival, kokonaiselossaolo)

Taulukko 5. Monimuuttuja-analyysi Immunoprofiililla. (1)

	Yksittäismuuttuja-analyysi	Tautispesifi elossaolo (n = 68)		Kokonaiselossaolo (n = 68)	
	p-arvo	HR (95 % CI)	p-arvo	HR (95 % CI)	p-arvo
Ikä					
< 60 vuotta	DSS: 0.614	1	0.038	1	0.018
≥ 60 vuotta	OS: 0.640	2.44 (1.05–5.67)		2.61 (1.18–5.79)	
Sukupuoli					
Nainen	DSS: 0.829	1	0.053	1	0.091
Mies	OS: 0.536	0.49 (0.24–1.01)		0.55 (0.28–1.10)	
TNM-luokka					
I		1	<0.001	1	<0.001
II	DSS: <0.001	2.79 (0.27–28.68)		1.03 (0.20–5.36)	
III		6.26 (0.66–59.29)		2.06 (0.45–9.42)	
IV	OS: <0.001	32.91 (2.88–375.66)		13.24 (2.23–78.55)	
MMR-status					
MSS	DSS: 0.010	5.23 (0.57–47.57)	0.142	8.90 (1.00–79.39)	0.050
MSI	OS: 0.004	1		1	
Immunoprofiili					

Matala	DSS: <0.001	6.34 (1.61–24.97)	0.008	3.57 (1.20–10.62)	0.022
Korkea	OS: <0.001	1		1	
Syövän sijainti					
Duodenum	DSS: 0.043	1		1	
Jejunum	OS: 0.015	0.58 (0.18–1.90)	0.001	0.57 (0.19–1.74)	0.002
Ileum		3.37 (0.79–14.32)		2.83 (0.70–11.41)	

(HR= hazard ratio, riskisuhde, CI= confidence interval, luottamusväli, DSS= disease-specific survival, tautikohtainen elossaolo, OS= overall survival, kokonaiselossaolo)

5 Pohdinta

Tutkimuksemme tulosten perusteella syövän immunologisella ympäristöllä on vaikutusta SBA:n ennusteeseen. Tulehdussolujen tunkeutuminen syöpäsolukkoon, sekä niiden PD-1- ja PD-L1-ilmentyminen ovat yleisiä MSI-syövässä. Yksittäisiä muuttujia tarkastellessa immunologiset parametrit (ICS, PD-1 ja PD-L1^{IC}) olivat merkittäviä ennusteellisia tekijöitä. Kuitenkin vain PD-L1^{IC} yhdistettynä MMR-statukseen säilyi ainoana tilastollisesti merkittävänä ennusteellisena tekijänä monimuuttuja analyysissä tautispesifin ja kokonaiselossaolon suhteen. Kolorektaalikarsinoomassa Immunoprofiili, joka muodostuu ICS:sta sekä PD-1 ja PD-L1^{IC}-positiivisuudesta, näytti olevan vahva yksittäinen ennusteellinen tekijä (21).

SBA:ssa PD-1 ja PD-L1:n ilmentymistä tutkivassa artikkelissa Thota ym (23) PD-1 ilmentyi voimakkaasti syövän läheisissä, sekä sen sisään tunkeutuneissa lymfosyyteissä (83 %). Lisäksi tutkimuksessa PD-L1:n ilmentyminen oli voimakasta sekä syöpäsoluissa (17 %), että syöpäkasvaimen sisään tunkeutuvissa lymfosyyteissä (43 %) (23). Tutkimuksessamme vähintään keskinkertaisella intensiteetillä värjäytyviä PD-L1^{TC}-positiivisia syöpiä oli 15 % ja PD-L1^{IC}-positiivisia syöpiä 69 %. Raja-arvona PD-L1^{IC}-positiivisuudelle Thota ym käyttivät 1%:ia, kun taas omassa tutkimuksessamme raja-arvona oli 5% (23). Mikäli huomioon olisi otettu myös heikosti värjäytyvät PD-L1-positiiviset solut, ≥ 1 % PD-L1^{TC}:tä ilmentyisi 21 % ja vastaavasti PD-L1^{IC}:tä ilmentyisi 85 %:ia syöivistä. Eriävään näyttöön on voinut vaikuttaa paitsi käytetyt vasta-aineet, myös se, että aineistossamme oli enemmän IV-luokan (TNM-luokka) SBA:ia verrattuna Thota ym tutkimukseen (37 % vs 20 %).

PD-1/PD-L1 reitin aktivaation roolia syövän synnyssä ei vielä täysin ymmärretä. Osassa tutkimuksista PD-1/PD-L1 aktivaatio on assosioitunut parempaan ennusteeseen, osassa huonompaan (24-32). Teoriassa PD-1/PD-L1 reitin aktivoitumisen tulisi heikentää elimistön immuunivastetta syöpäsoluja kohtaan. Melanoomassa, paksusuolisyövässä, sekä maha- ja keuhkasyövässä PD-1/PD-L1 aktivaation vaikutuksesta ennusteeseen ollut ristiriitaista näyttöä. Rintasyövässä ja Merkelinsolukarsinoomassa potilailla, joiden syöpäsolukossa on runsaasti PD-L1-positiivisia soluja, on parempi ennuste kuin jos PD-L1-positiivisia soluja on niukasti (33, 34). Puolestaan haima- ja munuaiskarsinoomissa, sekä munuaissarja- ja ruokatorvisyövässä PD-L1:n voimakas ilmentyminen on assosioitunut huonompaan ennusteeseen (35-38).

Yksi mahdollinen syy ristiriitaiselle näytölle PD-1/PD-L1-aktivaation vaikutuksesta syövän ennusteessa on se, että tutkimuksissa solujen PD-L1-värjäytyvyyden intensiteetit on huomioitu analyyseissä eri tavoin. Osassa tutkimuksia myös heikosti värjäytyneet solut on otettu huomioon, kun taas osassa vain vahvasti tai keskivahvasti värjäytyvät on huomioitu. Toisena syynä mahdollisesti on PD-L1-positiivisuuden määritelmä eri tutkimuksissa. Osassa tutkimuksista positiivisiksi on määritetty syövät, joissa >1 % soluista ilmentää PD-L1:stä, kun taas osassa ilmentyvien solujen osuus tuli olla >50 %, jotta syöpä määritettiin PD-L1-positiiviseksi. Kolmantena syynä ristiriitaiselle näytölle voi olla se, että eri tutkimuksissa PD-L1-positiiviset solut on käsitelty yhtenä muuttujana, kun taas osassa PD-L1:stä ilmentyvät syöpäsolut ja tulehdussolut on analysoitu erikseen (39, 40). Tutkimuksellisten haasteiden ohella ristiriitaisen näytön syynä voi olla PD-L1:n ilmentymisen muut vaikutukset kuin immuunivasteen heikentäminen: PD-L1 ei pelkästään inhiboi T-solujen jakautumista ja välittäjäainetuotantoa, mutta se myös lisää T-solujen aktivaatiota. Syytä T-soluaktivaatiolle ei tosin vielä tunneta. (41) Kuitenkin tutkimuksemme perusteella PD-L1^{IC}- ja PD-1-positiivisuus vaikuttaa SBA:n ennusteeseen myönteisesti. Tulos perustuu siihen, että vain syöpäsolukoon tunkeutuvat lymfosyytit laskettiin PD-L1-positiivisiksi. Koska PD-L1-positiivisissa syövässä on tällöin myös kaiken kaikkiaan runsaasti lymfosyyttejä, elimistön immuunivaste syöpää kohtaan on ollut voimakasta.

Pahanlaatuisissa kasvainsoluissa mutatoituneet geenit tuottavat proteiinisynteesin pohjalta väärin laskostuneita proteiineja, jotka toimivat niin sanottuina neoantigeeneinä. Elimistön immuunipuolustusjärjestelmä tunnistaa nämä neoantigeenit ja käynnistävät välittömästi puolustusreaktion tuntemattomia soluja kohti. Koska MSI-syövissä mutaatioita esiintyy MSS-syöpiä huomattavasti enemmän, tuottavat MSI-syövät runsaammin neoantigeeneja ja elimistön puolustusreaktio niitä kohden on voimakkaampi, ja immuunivaste muokkaa näin myös syövän evoluutiota (42). Tutkimuksemme tulokset tukivat tätä teoriaa, sillä MSI-syöville oli korkeampi ICS kuin MSS-syöville. Lisäksi MSI-syövissä oli enemmän PD-1 positiivisia lymfosyyttejä, sekä PD-L1^{IC}:n positiivisten syöpien osuus oli suurempi. Aineistossamme 15 % syövistä olivat mikrosatelliitti-instabiileja, joka vastaa aiemmissa tutkimuksissa olevaa suhdetta (13).

147:n SBA:n MMR-statusen jakaumaa, mutaatiotaakkaa sekä PD-L1:n ilmentymistä tutkittiin suuressa useita eri syöpiä käsittelevässä tutkimuksessa, jossa 14 % SBA:sta todettiin olevan suuri mutaatiotaakka (raja-arvo 17 mutaatiota/Mb). Lisäksi suuri mutaatiotaakka assosioitui MSI-syöpiin (43). Tutkimuksessamme suuren mutaatiotaakan raja-arvo oli matalampi (10 mutaatiota / Mb). Kuten oletimme, suuri mutaatiotaakka assosioitui MSI-syöpiin sekä korkeaan Immunoprofiiliin. Mutaatiotaakka oli suuri 18:lla (19 %) syövällä tutkimuksessamme. Kaikki tutkimuksessa mukana olleet MSI-syövät olivat suuren mutaatiotaakan kasvaimia, sillä kussakin MSI-syövässä oli vähintään 22.84 mutaatiota / Mb. Tutkimuksemme perusteella MSI-syövissä mutaatiotaakka on lähes aina suuri, jolloin myös immuunivaste on voimakas, eli Immunoprofiili on korkea. Koska suuren mutaatiotaakan MSI-syövät ovat yleisiä SBA:ssa, sekä PD-L1:n ilmentyminen on usein voimakasta, voisi PD-1/PD-L1 inhibiittorit mahdollisesti tehot mikrosatelliitti-instabiileihin SBA:iin. PD-1/PD-L1 inhibiittoreiden teho aiempien tutkimusten perusteella on osoitettu MSI-syövissä, joilla on suuri mutaatiotaakka ja runsas PD-L1 ilmentyminen (44). Osalla tutkimuksemme syövistä, joilla mutaatiotaakka oli suuri, ICS ja Immunoprofiili oli matala. Kuitenkin kaikki kolme Immunoprofiili 0 SBA:aa olivat suuren mutaatiotaakan syöpiä, sekä TNM-luokan mukaisesti III- tai IV-luokan syöpiä. Tämä viittaa siihen, että näissä tapauksissa syöpä on onnistunut pakenemaan immuunipuolustukselta.

SBA sijaitsee yleisimmin duodenumissa, mutta tämä vaihtelee jonkin verran lähteestä riippuen (3, 4). Omassa aineistossamme jejunum (53 %) oli yleisin sijainti SBA:lle, sen sijaan duodenumissa sijaitsi vain 18 % kasvaimista. Tätä eroa voi selittää aineistomme pieni koko. Syövän sijainti vaikutti taudin ennusteeseen, sillä ileumissa sijainneet syövät olivat huonompiennusteisia, kun duodenumissa tai ileumissa sijainneet. Toisaalta ileumissa sijainneet syövät olivat pääosin TNM-luokkaa IV.

Keliakiaa sairastavien SBA-potilaiden syöpä sijaitsi 67 %:lla jejunumissa. Lisäksi keliakiaan liittyvien syöpien ennuste oli parempi kuin ilman keliakiaa. (45, 46) Myös aineistomme perusteella keliakiaa sairastavien potilaiden ennuste on parempi. Todennäköinen syy paremmalle ennusteelle on se, että 73 % keliakiaan liittyvistä syöivistä oli MSI-syöpiä, sekä se, että keliakikkojen SBA:n TNM-luokka on matalampi (45). Aineistossamme 44 % keliakiaan assosioituvista SBA:sta oli MSI-syöpiä.

Tutkimuksemme tulokset viitteellisiä, aineistomme ollessa vähäinen. Lähes neljännes aineistosta jäi pois monimuuttuja-analyysistä klinisten tietojen puutteessa. Kuitenkin tutkimuksemme tulokset tarjoavat uutta tietoa huonoennusteisesta SBA:sta. Etenkin immunologisten työkalujen, ICS:n PD-1:n ja PD-L1^{IC}:n assosiaatio taudin ennusteeseen toi uutta näkökulmaa SBA:n ennustettavuuteen. Immunoprofiili ei ole kuitenkaan vakiintunut yksittäisenä työkaluna syöpien ennusteen arvioinnissa (21), mutta tutkimuksemme tulokset antavat vahvoja viitteitä siitä, että Immunoprofiilista voisi olla apua SBA:n ennusteen arvioinnissa.

6 Yhteenveto

Yksittäisinä muuttujina PD-1, PD-L1^{IC} ja ICS vaikuttivat sekä SBA:n tautikohtaiseen-, että kokonaisennusteeseen mutta ainoastaan PD-L1^{IC}-positiivisuus osoitti itsenäistä ennusteellista arvoa monimuuttuja-analyysissä. Yhdistämällä nämä kaikki kolme syövän immunologista parametria Immunoprofiiliksi, saadaan merkityksellistä informaatiota taudin ennusteesta. Toisaalta kolmen muuttujan yhteisvaikutus osoittautui merkittäväksi. Immunoprofiilin ennusteellinen arvio on yhä merkityksellisempi, kun se on mukautettuna

MMR-statukseen, TNM-tasoon, syövän sijaintiin ohutsuolessa, potilaan sukupuoleen ja ikään. Tällä voidaan arvioida melko luotettavasti sekä tautikohtaiseen, että kokonaisennusteeseen SBA:ssa.

Syöpäsolukoissa, joiden sisään tunkeutuvien lymfosyyttien PD-L1 ilmentyminen oli ≥ 1 % soluista, mutaatiotaakka oli suuri lähes poikkeuksetta. Nämä syöpäkasvaimet olivat tosin lähes poikkeuksetta mikrosatelliitti-instabiileja, jolloin mutaatiotaakka on jo ennestään suuri. Sen sijaan suureen mutaatiotaakkaan liittyvät useat immunologiset parametrit kuten korkea ICS, PD-1, PD-L1^{IC} ja Immunoprofiili. Nämä tulokset antavat viitteitä siitä, että SBA:n hoidossa PD-1/PD-L1 inhibiittoreista voisi olla hyötyä.

7 Oma työpanos vertaisarvioidussa artikkelissa

Olin toisena kirjoittajana vertaisarvioidussa artikkelissa ” Prognostic Value Of Immune Environment Analysis in Small Bowel adenocarcinomas in Verified Mutational Landscape and Predisposing Conditions” (1). Artikkelin julkaistiin Cancers-lehdessä 7/2020 ja tutkielmani perustuu täysin kyseiseen artikkeliin.

Kirjoitin kyseiseen artikkeliin johdannon (”introduction”), joka sisältää myös kirjallisuuskatsauksen. Analysoimme kumpikin itsenäisesti 1. kirjoittajan kanssa tutkimuksessa käytetyn aineiston. Eli teimme kumpikin manuaalisesti Qupath-sovelluksella CD3+, CD8+, PD-1 ja PD-L1+ solulaskennan ja kokosimme tulokset yhteen. Analysoinnista vastasin yksittäisten kliinispatologisten muuttujien ja Immunoprofiilin vaikutuksesta taudin ja tautispesifiin- ja kokonaisennusteeseen. Muodostin lisäksi artikkeliin taulukot 1 ja 2, sekä osan taulukosta 4 yksittäismuuttuja-analyysistä.

Lupa käyttää artikkelin materiaalia osana omaa tutkielmaa on saatu artikkelin kirjoittajilta, ja artikkelin materiaalia on tekijänoikeudellisesti lupa käyttää Creative Commons Attribution (CC BY) -lisenssin pohjalta (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Lähdeluettelo

1. Wirta EV, Szeto S, Hanninen U, Ahtiainen M, Bohm J, Mecklin JP, et al. Prognostic Value of Immune Environment Analysis in Small Bowel Adenocarcinomas with Verified Mutational Landscape and Predisposing Conditions. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8).
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
3. Hatzaras I, Palesty JA, Abir F, Sullivan P, Kozol RA, Dudrick SJ, et al. Small-bowel tumors: epidemiologic and clinical characteristics of 1260 cases from the connecticut tumor registry. *Arch Surg*. 2007;142(3):229-35.
4. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Wayne JD, Ko CY, Bennett CL, Talamonti MS. Small bowel cancer in the United States: changes in epidemiology, treatment, and survival over the last 20 years. *Ann Surg*. 2009;249(1):63-71.
5. Shenoy S. Genetic risks and familial associations of small bowel carcinoma. *World J Gastrointest Oncol*. 2016;8(6):509-19.
6. Bennett CM, Coleman HG, Veal PG, Cantwell MM, Lau CC, Murray LJ. Lifestyle factors and small intestine adenocarcinoma risk: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol*. 2015;39(3):265-73.
7. Aparicio T, Zaanani A, Svrcek M, Laurent-Puig P, Carrere N, Manfredi S, et al. Small bowel adenocarcinoma: epidemiology, risk factors, diagnosis and treatment. *Dig Liver Dis*. 2014;46(2):97-104.
8. Lech G, Korcz W, Kowalczyk E, Slotwinski R, Slodkowski M. Primary small bowel adenocarcinoma: current view on clinical features, risk and prognostic factors, treatment and outcome. *Scand J Gastroenterol*. 2017;52(11):1194-202.
9. Cahill C, Gordon PH, Petrucci A, Boutros M. Small bowel adenocarcinoma and Crohn's disease: any further ahead than 50 years ago? *World J Gastroenterol*. 2014;20(33):11486-95.
10. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
11. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(12):717-34.
12. Pages F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018;391(10135):2128-39.
13. Seppälä TT, Böhm JP, Friman M, Lahtinen L, Väyrynen VM, Liipo TK, et al. Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1966-75.
14. Tran E, Ahmadzadeh M, Lu YC, Gros A, Turcotte S, Robbins PF, et al. Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science*. 2015;350(6266):1387-90.
15. Schrock AB, Devoe CE, McWilliams R, Sun J, Aparicio T, Stephens PJ, et al. Genomic Profiling of Small-Bowel Adenocarcinoma. *JAMA Oncol*. 2017;3(11):1546-53.
16. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity*. 2016;44(3):698-711.

17. Wirta EV, Seppala T, Friman M, Vayrynen J, Ahtiainen M, Kautiainen H, et al. Immunoscore in mismatch repair-proficient and -deficient colon cancer. *J Pathol Clin Res*. 2017;3(3):203-13.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
19. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):5064-74.
20. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-54.
21. Ahtiainen M, Wirta EV, Kuopio T, Seppala T, Rantala J, Mecklin JP, et al. Combined prognostic value of CD274 (PD-L1)/PDCDI (PD-1) expression and immune cell infiltration in colorectal cancer as per mismatch repair status. *Mod Pathol*. 2019;32(6):866-83.
22. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878.
23. Thota R, Gonzalez RS, Berlin J, Cardin DB, Shi C. Could the PD-1 Pathway Be a Potential Target for Treating Small Intestinal Adenocarcinoma? *Am J Clin Pathol*. 2017;148(3):208-14.
24. Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011;28(3):682-8.
25. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. 2014;94(1):107-16.
26. Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *Eur J Cancer*. 2014;50(7):1361-9.
27. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010;116(7):1757-66.
28. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012;4(127):127ra37.
29. Gu L, Chen M, Guo D, Zhu H, Zhang W, Pan J, et al. PD-L1 and gastric cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182692.
30. Lee KS, Kwak Y, Ahn S, Shin E, Oh HK, Kim DW, et al. Prognostic implication of CD274 (PD-L1) protein expression in tumor-infiltrating immune cells for microsatellite unstable and stable colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(7):927-39.
31. Li Y, Liang L, Dai W, Cai G, Xu Y, Li X, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2016;15(1):55.
32. Shi SJ, Wang LJ, Wang GD, Guo ZY, Wei M, Meng YL, et al. B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(10):e76012.
33. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2014;20(10):2773-82.

34. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Luber BS, Wang H, et al. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(1):54-63.
35. Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 2):709s-15s.
36. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3360-5.
37. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(8):2947-53.
38. Wang L, Ma Q, Chen X, Guo K, Li J, Zhang M. Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma. *World J Surg.* 2010;34(5):1059-65.
39. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther.* 2016;9:5023-39.
40. Ilie M, Hofman V, Dietel M, Soria JC, Hofman P. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch.* 2016;468(5):511-25.
41. Yamazaki T, Akiba H, Koyanagi A, Azuma M, Yagita H, Okumura K. Blockade of B7-H1 on macrophages suppresses CD4+ T cell proliferation by augmenting IFN-gamma-induced nitric oxide production. *J Immunol.* 2005;175(3):1586-92.
42. Ballhausen A, Przybilla MJ, Jendrusch M, Haupt S, Pfaffendorf E, Seidler F, et al. The shared frameshift mutation landscape of microsatellite-unstable cancers suggests immunoediting during tumor evolution. *Nat Commun.* 2020;11(1):4740.
43. Salem ME, Puccini A, Grothey A, Raghavan D, Goldberg RM, Xiu J, et al. Landscape of Tumor Mutation Load, Mismatch Repair Deficiency, and PD-L1 Expression in a Large Patient Cohort of Gastrointestinal Cancers. *Mol Cancer Res.* 2018;16(5):805-12.
44. Tunger A, Sommer U, Wehner R, Kubasch AS, Grimm MO, Bachmann MP, et al. The Evolving Landscape of Biomarkers for Anti-PD-1 or Anti-PD-L1 Therapy. *J Clin Med.* 2019;8(10).
45. Potter DD, Murray JA, Donohue JH, Burgart LJ, Nagorney DM, van Heerden JA, et al. The role of defective mismatch repair in small bowel adenocarcinoma in celiac disease. *Cancer Res.* 2004;64(19):7073-7.
46. Caio G, Volta U, Ursini F, Manfredini R, De Giorgio R. Small bowel adenocarcinoma as a complication of celiac disease: clinical and diagnostic features. *BMC Gastroenterol.* 2019;19(1):45.